

**A *Streptomyces nitrosporeus* N<sub>2</sub>O-termelésének  
(aerob denitrifikáció) vizsgálata**

<sup>1</sup>KRISZT BALÁZS, <sup>1</sup>SZOBOSZLAY SÁNDOR és <sup>2</sup>DOBOLYI CSABA

<sup>1</sup> Gödöllői Agrártudományi Egyetem, Kémia és Biokémia Tanszék és

<sup>2</sup> Gödöllői Agrártudományi Egyetem, Mikrobiológia Tanszék, Gödöllő

Annak ellenére, hogy számos baktérium nemzetség tagjai (ZUMFT, 1992) és néhány eukarióta mikroszkopikus gomba (BURTH et al., 1982; SHOUN & TANIMOTO, 1991) képes a nitrátot és/vagy a nitritet alacsony oxigén-koncentráció mellett gáz halmazállapotú terméké (N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, esetlegesen NO) redukálni, s ily módon lélegezni, erre az energianyerési folyamatra a sugárgombáknál a mai napig nem derült fény (1. táblázat). Mindössze FJODOROV és KUDRJASOVA (1955), valamint FJODOROV és ILJINA (1956) számolt be arról, hogy KRASZILNYIKOV (1949) rendszere alapján az *Actinomyces globosus* és az *Actinomyces globisporus vulgaris* fajokként leírt sztreptomiceták anaerob körülmények között nitrogént termelnek.

E tulajdonság hiánya a sztreptomiceszek esetében igen figyelemre méltó lenne, hiszen e prokarióta mikroszervezet-csoport tagjainak a talajéletben betöltött szerepe igen nagy, csaknem az összes mineralizációs folyamatot döntően befolyásolják (GOODFELLOW & WILLIAMS, 1983). Időlegesen kialakuló ill. helyi oxigénhiány esetén a nitrátlégzés lehetne az a stratégia, amely az aerob energia-konzerválást (ATP-szintézis) fenntartja.

Az elmúlt évtized kutatásai megdöntötték azt a tézist, hogy a denitrifikáció létrejöttéhez ill. lefolyásához elengedhetetlenül szükséges a teljes anaerobiózis kialakulása (ROBERTSON & KUENEN, 1984). OTTOW és FABIG (1985) kísérleteikben azt bizonyították, hogy a nitrát ill. az oxigén elektronakceptorként való felhasználása bizonyos törzseknél párhuzamosan zajlik, azaz a respirációra és a denitrifikációra egyidejűleg is sor kerülhet. További kísérletek azt mutatták, hogy bizonyos ökológiai körülmények között a denitrifikációs aktivitás oxigén és nitrát együttes jelenlétében nagyobb is lehet, mint anaerob körülmények között (OTTOW & FABIG, 1985; ROBERTSON & KUENEN, 1990; BELL & FERGUSON, 1991).

A fentiek tükrében arra kerestük a választ, hogy a döntően aerob sztreptomiceszeknél kimutatható-e denitrifikációs aktivitás, avagy ez a környezeti szempontból sem elhanyagolható kérdés - gondoljunk a képződött N<sub>2</sub>O ózonbontó

## 1. táblázat

Potenciálisan denitrifikációra képes mikroszervezet nemzetségek, elterjedtségük és származásuk SCHMIEDER (1984) alapján

(1) Nemzetség neve	(2) Denitrifikáló fajok száma**	(3) Előfordulás
<b>PROKARIÓTÁK</b>		
<b>ORGANOTRÓF</b>		
<b>Aerob</b>		
<i>Pseudomonas</i>	a) sok	e) vizek, talajok, szennyvizek, tenger
<i>Alcaligenes</i>	a) sok	f) vizek, talajok, szennyvizek
<i>Achromobacter</i>	b) néhány	f) vizek, talajok, szennyvizek
<i>Acinetobacter</i>	b) néhány	f) vizek, talajok, szennyvizek
<i>Flavobacterium</i>	b) néhány	g) vizek, tengerek, üledékek
<i>Neisseria</i>	a) sok	h) ember (klinikai izolátumok)
<i>Moraxella</i>	b) néhány	h) ember (klinikai izolátumok)
<i>Cellulomonas*</i>	b) néhány	i) talajok
<i>Halobacterium*</i>	b) néhány	j) tenger, sós víz
<i>Cytophaga</i>	b) néhány	k) szennyvizek, talajok
<i>Flexibacter*</i>	c) egy	i) talaj
<i>Ochrobactrum*</i>	b) néhány	h) ember (klinikai izolátumok)
<i>Rugamonas*</i>	c) egy	l) víz
<i>Propionibacterium*</i>	b) néhány	m) tejtermék, béltraktus
<b>Oligokarbofil</b>		
<i>Aquaspirillum*</i>	b) néhány	n) vizek, üledék
<i>Hyphomicrobium</i>	b) néhány	l) vizek
<b>Termofil</b>		
<i>Thermothrix*</i>	c) egy	o) melegvízű forrás
<i>Bacillus</i>	b) néhány	i) talajok
<b>Spórás</b>		
<i>Bacillus</i>	a) sok	p) talajok, üledékek
<b>N<sub>2</sub>-fixáló</b>		
<i>Rhizobium</i>	b) néhány	i) talajok
<i>Azospirillum</i>	b) néhány	r) talajok, rhizoszféra
<i>Rhodopseudomonas</i>	d) kevés	l) vizek
<b>(Fakultatív) anaerob</b>		
<i>Chromobacterium*</i>	c) egy	i) talaj
<i>Enterobacter</i>	a) sok	s) vizek, talajok, béltraktus
<i>Escherichia</i>	a) sok	s) vizek, talajok, béltraktus
<i>Serratia</i>	b) néhány	f) vizek, talajok, szennyvizek
<i>Eikenella*</i>	c) egy	h) ember (klinikai izolátum)
<i>Vibrio</i>	b) néhány	t) vizek, szennyvizek

## 1. táblázat folytatása

(1) Nemzetség neve	(2) Denitrifikáló fajok száma**	(3) Előfordulás
<b>FOTOTRÓF</b> <i>Erythrobacter</i> * <i>Rhodopseudomonas</i>	c) egy d) kevés	u) tenger l) vizek
<b>LITOTRÓF</b> <i>Paracoccus</i> (H <sub>2</sub> ) <i>Thiobacillus</i> (S) <i>Thiosphaera</i> <i>Thiomicrospira</i> (S) <i>Beggiatoa</i> <i>Nitrosomonas</i> (NH <sub>4</sub> )	b) néhány c) egy b) néhány c) egy c) egy d) kevés	i) talaj l) víz v) talaj, víz l) víz n) víz, üledék
<b>EUKARIÓTÁK</b> <i>Fusarium</i> <i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i>	b) néhány d) kevés d) kevés	x) talajok, növények i) talajok x) talajok, növények

\* 1984 után (a szerzők kiegészítései), \*\* SCHMIEDER (1984) terminológiája alapján

ill. üvegházhatást befolyásoló hatásaira (KERR, 1990; RODHE, 1990; REYE, 1994) - csak a detektálási módszerek kisebb érzékenysége miatt nem volt korábban bizonyítható.

### Anyag és módszer

Munkánkhoz - amely a Deutscher Akademischer Austauschdienst ösztöndíjával a giesseni Justus Liebig Egyetem Mikrobiológiai Tanszékén, ill. az F 5452 OTKA pályázat keretében a Gödöllői Agrártudományi Egyetem Kémia és Biokémia Tanszékén folyt - tesztmikroszervezetként az előkísérletek során kiválasztott *Streptomyces nitrosporeus*<sup>T</sup> (DSM 40023) törzset használtuk, melynek fenntartása zabpehelyagaron (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966) történt. A rázott tenyészetek inokulálásához steril fiziológiás sóoldattal spóraszuszpenziót készítettünk, melynek 5-5 ml-ével beoltottunk 300 ml-es Erlenmeyer lombikokban lévő glicerinnitrát (KÜSTER & WILLIAMS, 1964) - rázógyöngyöt is tartalmazó - táplevest. A beoltott lombikokat sík-kör rázógépen, 28 °C-on, 250/perc fordulaton, 72 órán keresztül inkubáltuk. Az így kapott szuszpenziók 1-1 ml-ével beoltottunk 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban lévő 30 ml glicerinnitrát tápoldatot, majd a beoltott lombikokat gázok számára át nem járható, steril gumidugóval zártuk le. Az ezután következő 6 napos, 28 °C-on történő inkubáció alatt az oxigén-koncentráció folyamatos csökkenése mellett a denitrifiká-

cióra indukálódott tenyészet 1 ml-ével oltottunk be újabb 30 ml glicerín-nitrát táplevelessel feltöltött és gumidugóval lezárt 100 ml-es Erlenmeyer lombikot.

A kívánt oxigén-koncentráció beállítása a lombikokban baktériumszűrőn átengedett, steril He vagy N<sub>2</sub> ill. O<sub>2</sub> gázokkal, a pH mérése üvegelektrodás "Corning 2000" készülékkel történt, a pH-hatás vizsgálatakor a rázott tenyészetek eltérő kiindulási pH-értékeit NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O ill. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O pufferekkel állítottuk be.

## 2. táblázat

**Különböző specifikus inhibitorok hatása a *Streptomyces nitrosporeus* növekedésére légzés (elektronakceptor oxigén) ill. nitrátlégzés (elektronakceptor nitrát és/vagy nitrit) során**

(1) Inhibitor	(2) Koncentráció (mM)	(3) Respiráció gátlás (%)	(4) Denitrifikáció gátlás (%)	(5) Gátlás helye
Antimicin-A	0,03 és 0,09	0	0	citokróm-b
8-hidroxikinolin	10	100	100	citokróm-b
Nátrium-klorit	2,5	0	100	kompetitív a nitrittel
Oligomicin	0,04	90	0	Respiráció (NADH → O <sub>2</sub> )

A különböző specifikus inhibitorokat a 2. táblázatban leírt koncentrációkban steril baktériumszűrőn keresztül adtuk a tápoldatokhoz, autoklávozás és/vagy beoltás után (MALINOWSKY & OTTOW, 1991). Inkubáció: 28 °C, 100/perc fordulat, pH = 6,5-7,0.

Az így kapott tenyészetek inkubációjára a különböző vizsgálandó körülmények között 10-14 napig került sor, napi gázmintavétellel (250 µl-es és 1 ml-es gázfecskendő, lezárható és nyomásálló szeleppel, Dynatech, USA), gázkromatográfiás és spektrofotometriás mintaelemzéssel. 24 óránként csíraszám meghatározást is végeztünk határhígítási, lemezöntési módszerrel ill. Spiral Plater (Model C, Spiral System Inst., INC., Maryland, USA) készülékkel, glicerín-nitrát agaron.

A gáztérből vett minták analízisét Hewlett Packard 5890 készüléken végeztük SIMARMATA et al. (1993) nyomán, saját módosításokkal. A készüléket két bemeneti kapuval ill. két detektorral láttuk el. Mivel az O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> ill. CO<sub>2</sub> méréshez két különböző oszlopot használtunk, de ugyanazt a detektort (TCD), ezért beiktattunk a rendszerbe egy manuális gázáram váltó HP 18900 K típusú 6 utas szelepet, amellyel a mérési igénynek megfelelő oszlopra terelhető a minta. N<sub>2</sub>O elemzés: ECD detektor, Porapak Q oszlop (2m, fém, 1/8", 80-100 mesh), N<sub>2</sub> vivőgáz 30 ml/min. O<sub>2</sub> és N<sub>2</sub> elemzés: TCD det., Molsieve 5A oszlop (2m, fém, 1/8", 60-80 mesh), He vivőgáz 40 ml/min. CO<sub>2</sub> elemzés: TCD

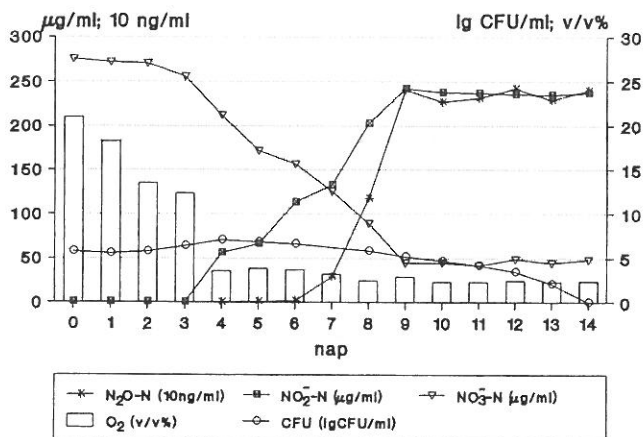
det., Porapak Q oszlop (2m, fém, 1/8", 80-100 mesh), He vivőgáz 40 ml/min. Az oszloptér hőmérséklete 50 °C, injektor: 70 °C, szelep: 80 °C, TCD: 150 °C, ECD: 300 °C. A gázanalízisek eredményeit a gázok vízben való oldhatóságával korrigálva adtuk meg.

A tápoldatokból a nitrát-koncentrációt NAVONE (1964) módszere szerint, a nitrit-koncentrációt a német szabvány (DIN 38405 - D 10, 1981) alapján Jenway 6105 UV/VIS és U-2000 Hitachi spektrofotométerekkel mértük.

### Eredmények

A *Streptomyces nitrosporeus* sugárgomba esetében az oxigén-koncentráció 12-14 v/v%-ra való lecsökkenése után megkezdődik a nitrát egyenletes redukálása nitritté, szinte az oxigén-felhasználással megegyező intenzitással (1. ábra). A 4. nap után, amikor az oxigéntartalom 3 v/v% alá süllyed és ezáltal felhasználható elektronakceptorként szinte kizárólag a nitrát ill. a termelődő nitrit áll rendelkezésre, megindul a dinitrogén-oxid képződése is, melynek maximális értéke 2,5 µg/ml táptalaj. A 9-10. napon megkezdődik a törzs pusztulása, ami mind az elektronakceptorok hiányára, mind a tápanyagok elfogyására visszavezethető.

A specifikus inhibitorok alkalmazásával végzett kísérleteket a 2. táblázatban foglaltuk össze. Megállapítható, hogy az antimicin-A antibiotikumra a *Streptomyces nitrosporeus* törzs rezisztens, míg a 8-hidroxikinolin mind aerob, mind oxigénhiányos környezetben gátolja a citokróm-b rendszeren keresztül az elektrontranszportot. A nitráttal kompetitív nátrium-klorit csak az oxigénszegény,

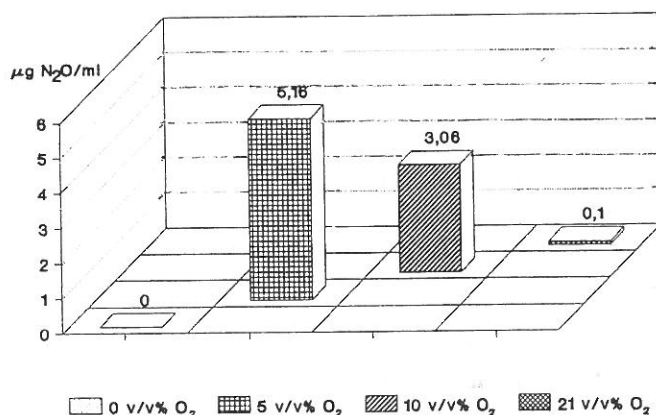


1. ábra

A *Streptomyces nitrosporeus* törzs N<sub>2</sub>O-termelése, oxigénfogyasztása, nitrát-redukciója, nitrit-akkumulációja és csíraszám alakulása az idő függvényében (inkubáció: 28 °C, 100 rpm, pH = 6,8)

míg a respirációt akadályozó oligomicin csak oxigénellátott viszonyok között fejt ki gátló hatást a törzs növekedésére.

Az AIT-technika (Acetylene-Inhibition-Technique) alkalmazásakor - amely azon a megfigyelésen alapszik, hogy az acetilén gáz alacsony koncentrációban (0,1-2 v/v%) specifikusan gátolja a dinitrogén-oxid-reduktáz enzim működését, s így indirekt módon mérhető a képződött nitrogén mennyisége (YOSHINARI & KNOWLES, 1976) - azt tapasztaltuk, hogy 0,1, 1,0 és 2,0 v/v% acetilén-koncentráció mellett 14 napos inkubáció során a kontrollhoz képest a gázmintákban nincs szignifikáns  $N_2O$ -tartalom növekedés.

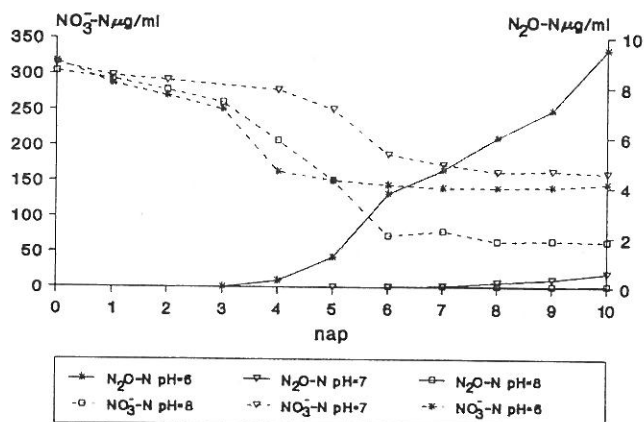


2. ábra

A *Streptomyces nitrosporeus* törzs által termelt  $N_2O$  mennyisége az oxigén-koncentráció függvényében (inkubáció: 14 nap, 28 °C, 100 rpm, pH = 6,8)

Az oxigén-koncentráció  $N_2O$ -termelésre kifejtett hatását a 2. ábra mutatja, amelyen a különböző oxigéntartalmakhoz tartozó, az inkubáció során képződött összes dinitrogén-oxid mennyiségeket ábrázoltuk. Az eredmények azt mutatják, hogy a *Streptomyces nitrosporeus* sem anaerob (nincs növekedés), sem aerob (21 v/v%  $O_2$ ) körülmények között nem termel  $N_2O$ -t, illetve az utóbbi esetben nyomokban kimutatható. Csökkentett oxigén parciális nyomás mellett, szemi-aerob körülmények között azonban intenzív dinitrogén-oxid-termelésbe kezd. Figyelemre méltó, hogy 5 v/v% oxigén-koncentráció esetén a 10 v/v% alatt képződött mennyiség majd kétszerese, 5,16  $\mu g N_2O/ml$  szabadult fel.

A hidrogénion-koncentráció dinitrogén-oxid-képződésre gyakorolt hatását a 3. ábra mutatja. A 10 napos inkubáció során a pH-érték megváltoztatása jelentősen befolyásolta a  $N_2O$ -termelést. Az enyhén savas közegben (pH = 6,0) a képződött  $N_2O$ -N mennyisége közel 10  $\mu g/ml$ , míg ugyanez az érték semleges pH-jú tápoldatban 0,5, lúgos közegben (pH = 8,0) pedig mindössze 0,062  $\mu g/ml$ . Megemlíthető, hogy az enyhén lúgos pufferben a törzs növekedése sem

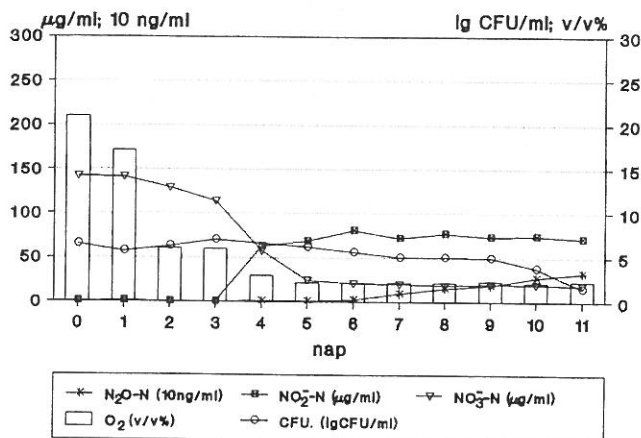


3. ábra

A *Streptomyces nitrosporeus* törzs nitrátredukciója és  $\text{N}_2\text{O}$ -termelése különböző pH-értékek függvényében (inkubáció: 10 nap, 28 °C, 100 rpm)

volt kielégítő, azonban 7-es és 8-as pH esetében a csíraszámok alakulása közel azonos volt. Leolvasható továbbá a 3. ábráról, hogy a legmagasabb  $\text{N}_2\text{O}$ -termelési ráta nem jár együtt a legnagyobb mennyiségű nitrát nitritté redukálásával.

A 4. ábrán a kiindulási nitrát-koncentráció 50%-os lecsökkentésének dinitro-génoxid-termelésre gyakorolt hatását láthatjuk. Összehasonlítva az 1. ábrával



4. ábra

A *Streptomyces nitrosporeus*  $\text{N}_2\text{O}$ -termelése, oxigénfogyasztása, nitrátredukciója, nitrit-akkumulációja és csíraszám 142  $\mu\text{g/ml}$  nitrát-koncentráció mellett (inkubáció: 28 °C, 100 rpm, pH = 6,8)

megállapítható, hogy a kiindulási nitráttartalom felére csökkentése közel egy nagyságrenddel kevesebb  $N_2O$  termeléséhez vezetett, hiszen a 2,4  $\mu\text{g/ml}$  helyett mindössze 0,32  $\mu\text{g/ml}$   $N_2O$ -N szabadult fel.

### Az eredmények értékelése

Az 1. és 2. ábrák eredményei azt sugallják, hogy a vizsgálatba vont *Streptomyces nitrosporeus* sugárgomba törzs a nitrátot, lecsökkent oxigén-koncentráció esetén, elektronakceptorként képes felhasználni, s időleges és/vagy helyi oxigénhiány kialakulásakor az aerob ATP-szintézis fenntartását a nitrát nitritté ill. kisebb mértékben dinitrogén-oxiddá redukálásával éri el. Figyelemre méltó, hogy anaerob környezetben, kezdeti oxigénellátás nélkül, a törzs egyáltalán nem mutat növekedést, míg aerob viszonyok között nem végez számottevő disszimilatív nitrátredukciót.

A 2. ábra eredményei azt mutatják, hogy a növekvő oxigén parciális nyomással csökken a termelődő  $N_2O$  mennyisége, ami feltehetően a nitrát- ill. a nitrit-reduktáz enzimek  $O_2$ -érzékenységeire vezethető vissza. Ezt a jelenséget más baktériumok esetében több szerző is leírta (BONIN et al., 1989; MCKENNEY et al., 1994), azonban a denitrifikációban résztvevő enzimek ill. enzimkomplexek oxigénre való érzékenysége jóval inkább mikroszervezet specifikus, mint koncentráció függő (KNOWLES, 1982; LLOYD et al., 1987).

A 2. táblázat eredményeiből megállapítható, hogy a *Streptomyces nitrosporeus* törzs nitrátredukciója során az elektrontranszportban - a más baktériumoknál megismert denitrifikációs folyamatokhoz hasonlóan (HOCHSTEIN, 1988; ZUMFT, 1992) - a citokró-m-b rendszer vesz részt. A nitrittel kompetitív nátrium-klorit oxigénmentes környezetben okozott, a növekedést 100 %-osan gátló hatása is megerősíti azt a feltevést, hogy a nitrit az elektrontranszportban szintén akceptorként működik közre, s e folyamat gátlása a tenyészet pusztulásához vezet. A denitrifikáció tényét erősítik az oligomicinnel végzett kísérletek eredményei is, mivel a respirációt gátló antibiotikum a nitrátlégzés stádiumában nem akadályozta a tenyészet növekedését.

Az AIT-technikával végzett kísérletek eredményei megerősítik az inkubáció alatti gáztér-analízisek során kialakított feltevést, mely szerint a vizsgálatba vont *Streptomyces nitrosporeus* sugárgomba esetében a denitrifikáció részleges, végterméke  $N_2O$  és nem  $N_2$ . Ezt a jelenséget már több szerző leírta más baktériumok esetében is, a leggyakrabban hiányzó ill. represszált enzimkomplex a nitrát- vagy a dinitrogén-oxid-reduktáz (FIRESTONE & DAVIDSON, 1989). Meg kell említeni, hogy egyes szerzők szerint a magas nitrát-koncentráció gátolja a  $N_2O$ -reduktáz működését (BLACKMER & BREMNER, 1978; LALISSE-GRUNDMANN et al., 1988), míg mások a gyors nitrit-akkumulációra vezetik vissza ugyanezt a hatást (TIEDJE et al., 1984).



### Összefoglalás

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a részletes vizsgálatba vont *Streptomyces nitrosporeus* törzs, amennyiben a kezdeti növekedéshez elegendő oxigén áll rendelkezésére, kialakult oxigénhiány esetén a nitrátot ill. nitritet képes az elektrontranszportban akceptorként felhasználni, s így anaerob körülmények között a légzést fenntartani.

A folyamat végterméke nem molekuláris nitrogén, hanem a környezeti szempontból káros hatású dinitrogén-oxid. A denitrifikáció során képződő  $N_2O$  mennyiségére az oxigén-koncentráció mellett, mind a közeg pH-ja, mind a nitrát-koncentráció jelentős hatással van.

### Irodalom

- BELL, C. L. & FERGUSON, J. C., 1991. Nitric and nitrous oxide reductases are active under aerobic conditions in cells of *Thiosphaera pantotropha*. *Biochem. J.* **273**. 423-427.
- BLACKMER, A. M. & BREMNER, J. M., 1978. Inhibitory effect of nitrate on reduction of  $N_2O$  to  $N_2$  by soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **10**. 187-191.
- BONIN, P., GILEWICZ, M. & BERTRAND, J. C., 1989. Effects of oxygen on each step of denitrification on *Pseudomonas nautica*. *Can. J. Microbiol.* **35**. 1061-1064.
- BURTH, I., BENCKISER, G. & OTTOW, J. C. G., 1982.  $N_2O$ -Freisetzung aus Nitrit (Denitrifikation) durch ubiquitäre Pilze unter aeroben Bedingungen. *Naturwiss.* **69**. 598-599.
- DIN 38405-D10, 1981. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung des Nitrit-Ions. Verlag Beuth, Berlin.
- FJODOROV, M. W. & ILJINA, T. K., 1956. Otnosenije pocsvennüh aktinomicetov k razlicsnüm isztocsnnyikam azoļa i ih ammonificirujuscšaja aktyivnoszty. *Mikrobiologija*. **25**. (5). 537-545.
- FJODOROV, M. W. & KUDRJASOVA, T. K., 1955. Denitrificirujuscšaja aktivnoszti neko-torüh pocsvennüh aktinomicetov. *Dokladi Akad. Nauk. CCCP*. **102**. (6). 1211-1214.
- FIRESTONE, M. K. & DAVIDSON, E. A., 1989. Microbiological basis of  $NO$  and  $N_2O$  production and consumption in soil. In: *Exchange of Trace Gases Between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere*. (Eds.: ANDREAE, M. O. & SCHMEL, D. S.) 7-21. John Willey & Sons Ltd.
- GOODFELLOW, M. & WILLIAMS, S. T., 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**. 189-216.
- HOCHSTEIN, L. I., 1988. The enzymes associated with denitrification. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**. 231-261.
- KERR, A., 1990. The chemistry of gaseous nitrogen compound in the troposphere. *EAWAG-News*. **30**. 23-24.
- KNOWLES, R., 1982. Denitrification. *Microbiol. Rev.* **46**. 43-70.
- KRASZILNYIKOV, N. A., 1949. Opregyelitel bakterij l aktinomicetov. A. N. SSSR. Moszkva.

- KÜSTER, E. & WILLIAMS, S. T., 1964. Selection of media for isolation of Streptomyces. *Nature*. **202**. 928-929.
- LALISSE-GRUNDMANN, G., BRUNEL, B. & CHALAMET, A., 1988. Denitrification in a cultivated soil: Optimal glucose & nitrate concentration. *Soil Biol. Biochem.* **20**. 839-844.
- LLYOD, D., BODDY, L. & DAVIES, K. J. P., 1987. Persistence of bacterial denitrification capacity under aerobic conditions: the rule rather than the exception. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**. 185-190.
- MALINOWSKY, P. & OTTOW, J. C. G., 1985. Ökologische Bedingungen der Denitrifikation bei Pilzen. *Landwirtsch. Forsch.* **38**. 115-121.
- MCKENNEY, D. J. et al., 1994. Kinetics of denitrification by *Pseudomonas fluorescens*: oxygen effects. *Soil Biol. Biochem.* **26**. 901-908.
- NAVONE, R. 1964. Proposed method for nitrate in potable waters. *J. Am. Waters Works Assoc.* **56**. 781-783.
- OTTOW, J. C. G. & FABIG, W., 1985. Influence of oxygen aeration on denitrification and redox level in different bacterial batch culture. In: *Planetary Ecology* (Eds.: CALDWELL, D. E. et al.) 427-440. Van Nostr & Reinhold Comp., New York.
- REYE, B., 1994. Der Teufelskreis - Ozonloch und Treibhauseffekt schaukeln sich auf. *Bild der Wissenschaft.* **2**. 66-71.
- ROBERTSON, L. A. & KUENEN, J. G., 1984. Aerobic denitrification - old wine in new bottles? *Antonie van Leeuwenhoek.* **50**. 525-544.
- ROBERTSON, L. A. & KUENEN, J. G., 1990. Physiological and ecological aspects of aerobic denitrification, a link with heterotrophic nitrification. In: *Denitrification in Soil and Sediment*. (Eds.: REVSBECH, N. P. & SORENSEN, J.) 91-104. Plenum Press, New York - London.
- RODHE, H., 1990. A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse effect. *Science*. **248**. 1217-1219.
- SCHMIEDER, F. & OTTOW, J. C. G., 1984. Die denitrifizierende Flora unterschiedlich belasteter Fließ- und Stillgewässer. *Landwirtsch. Forsch.* **37**. 181-194.
- SHIRLING, E. B. & GOTTLIEB, D., 1966. Methods for characterization of Streptomyces species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**. 313-340.
- SHOUN, H. & TANIMOTO, T., 1991. Denitrification by the Fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of Cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *J. Biol. Chem.* **266**. 11078-11082.
- SIMARMATA, T., BENCKISER, G. & OTTOW, J. C. G., 1993. Effect of an increasing carbon: nitrate-N ratio on reliability of acetylene in blocking the N<sub>2</sub>O-reductase activity of denitrifying bacteria in soil. *Biol. Fertil. Soils* **15**. 107-112.
- TIEDJE, J. M. et al., 1984. Anaerob processes in soil. *Plant and Soil*. **76**. 197-212.
- YOSHINARI, T. & KNOWLES, R., 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **69**. 705-710.
- ZUMFT, W. G., 1992. The denitrifying prokaryotes. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. (Eds.: BALOWS, A. et al.) Vol I. 554-582. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo-Hong Kong-Barcelona-Budapest.

## Nitrous Oxide Release (Aerobic Denitrification) by *Streptomyces nitrosporeus*

<sup>1</sup> B. KRISZT, <sup>1</sup> S. SZOBOSZLAY and <sup>2</sup> CS. DOBOLYI

<sup>1</sup> Department of Chemistry and Biochemistry, University of Agricultural Sciences and

<sup>2</sup> Department of Microbiology, University of Agricultural Sciences, Gödöllő (Hungary)

### Summary

Nitrous oxide produced from nitrate by *Streptomyces nitrosporeus* DSM 40023 was investigated in *in vitro* model experiments gained with 14 days incubation under standard conditions (28 °C, 100 rpm, pH = 6.5-7.0, initial atmospheric O<sub>2</sub> concentration) and with specific inhibitors (Antimycin-A, Oligomycin, 8-hydroxyquinoline, sodium chlorite). Based on this it is possible to assume that *Streptomyces nitrosporeus* can use both nitrate and nitrite as acceptors in the electron transport chain, and so maintain its respiration.

The use of the Acetylene Inhibition Technique (AIT), at rates of 0.1; 1.0; 2.0 %v/v C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, confirms that the end-product of the process is not N<sub>2</sub> but N<sub>2</sub>O, which is slightly harmful in terms of the environment.

Besides the oxygen concentration, both the pH of the medium and the nitrate concentration significantly affect the amount of N<sub>2</sub>O gas developed in the course of nitrate reduction. *Streptomyces nitrosporeus* does not produce N<sub>2</sub>O under anaerobic (no growth) or under aerobic (21 %v/v O<sub>2</sub>) conditions. However, at decreased partial O<sub>2</sub> pressure (at 5 or 10 %v/v) during the 14-day incubation period the amount of N<sub>2</sub>O developed increases until it reaches the 5.2 µg/ml nutrient solution level. The amount of N<sub>2</sub>O developed in slightly acidic medium (pH = 6) is twenty times higher than that released at neutral pH and 200 times higher than that measured in alkaline nutrient solution (pH = 8). The 50% decrease in the nitrate concentration reduces the production of N<sub>2</sub>O to a tenth.

*Table 1.* Potential denitrifying genera of microorganisms, their habitats and the site of isolation according to SCHMIEDER (1984). (1) Name of genera. (2) Number of denitrifying species\*\*. a) Many; b) several; c) one; d) few. (3) Habitat. e) fresh water, soil, sewage, seawater; f) fresh water, soil, sewage; g) fresh water, seawater, sediment; h) humans (clinical isolates); i) soil; j) seawater, saline water; k) sewage, soil; l) fresh water; m) dairy products, intestines; n) fresh water, sediment; o) hot springs; p) soil, sediment; r) soil, rhizosphere; s) fresh water, soil, intestines; t) fresh water, sewage; u) seawater; v) soil, fresh water; x) soil, plants. \*after 1984 (additions made by authors); \*\* based on the terminology of SCHMIEDER (1984).

*Table. 2.* Effect of various specific inhibitors on the growth of *Streptomyces nitrosporeus* during respiration (electron acceptor oxygen) and nitrate respiration (electron acceptor nitrate and/or nitrite). (1) Inhibitor. (2) Concentration (mM). (3) Respiration inhibition (%). (4) Denitrification inhibition (%). (5) Site of inhibition.

Fig. 1.  $N_2O$  release,  $O_2$  consumption, nitrate reduction, nitrite accumulation and colony count of *Streptomyces nitrosporeus* during an incubation period of 14 days (28 °C, 100 rpm, initial pH = 6.8).

Fig. 2. Effect of different  $O_2$  concentrations on  $N_2O$  release by *Streptomyces nitrosporeus* during an incubation period of 14 days (28 °C, 100 rpm).

Fig. 3. Effect of different pH values on nitrate reduction and  $N_2O$  release by *Streptomyces nitrosporeus* during an incubation period of 10 days (28 °C, 100 rpm).

Fig. 4. Effect of low nitrate concentration on  $N_2O$  release,  $O_2$  consumption, nitrate reduction, nitrite accumulation and colony count of *Streptomyces nitrosporeus* during an incubation period of 10 days (28 °C, 100 rpm, initial pH=6.8).